

一种观察酿酒酵母原生质体的简易方法

刘青,肖冬光*,姜天笑,毕琳

(天津科技大学生物工程学院,天津工业微生物重点实验室,天津 300222)

摘要: 酿酒酵母(*Scerevisiae*)原生质体不需任何染色剂染色,只需使用血球计数板,在光学显微镜下能清晰地观察原生质体形态,而且显微照相效果良好。该方法程序简单、操作方便、效果良好。

关键词: 酿酒酵母; 原生质体; 显微摄影观察

中图分类号:TS261.1-33 文献标识码:B 文章编号:1001-9286(2005)06-0123-02

A Simple Approach to Observing *S.cerevisiae* Protoplast

LIU Qing, XIAO Dong-guang, JIANG Tian-xiao and BI Lin

(Bioengineering College of Tianjin Science & Technology University; Tianjin Key Lab of Industrial Microbes, Tianjin 300222, China)

Abstract: The form of *S.cerevisiae* protoplast was observed clearly by optical microscope through using blood counting chamber alone (no use of staining agents). Besides, satisfactory photomicrograph effects could be achieved. Such method was simple to operate. (Tran. by YUE Yang)

Key words: *S.cerevisiae*; protoplast; photomicrography observation

原生质体融合技术是重要的工业酿酒酵母育种技术之一,制备原生质体是此技术的关键步骤。在原生质体的形成和融合过程中,需要借助光学显微镜随时进行活体观察。通过对酿酒酵母原生质体的观察方法进行研究,本文报道了一种使用血球计数板在光学显微镜下直接观察酵母菌原生质体的简易方法。

1 材料与方 法

1.1 菌株

酿酒酵母(*S.cerevisiae*),本实验室保存。

1.2 培养基

YEPD 培养基:酵母膏 1 g,蛋白胨 2 g,葡萄糖 2 g,琼脂 2 g,水 100 mL。

高渗培养基:0.8 mol/L 山梨醇配制的 YEPD 培养基。

1.3 试剂

PBS 液(0.2 mol/L KH_2PO_4 - K_2HPO_4 加入 0.8 mol/L 山梨醇, pH 5.8)为缓冲液,0.8 mol/L 山梨醇为高渗液;以 PBS 配制的 2% β -巯基乙醇(0.45 μm 滤膜抽滤灭菌)为脱壁促进剂,PBS 配制的 2%蜗牛酶(经 0.45 μm 滤膜抽滤灭菌);以上试剂均为分析纯。

1.4 仪器

光学显微镜,显微摄影仪(日本,OLYMPUS)。

1.5 实验方法

1.5.1 菌体的培养

斜面保存的菌株接入种子培养基,28℃振荡培养 16 h,再以 10%接种量转至新鲜的 YEPD 液体培养基,28℃振荡培养 6 h。

1.5.2 原生质体的制备

取对数生长中期细胞(经离心收集的菌体),用 PBS 溶液洗涤两次,0.1% β -巯基乙醇处理 15 min 后洗涤离心,加 2%蜗牛酶 30℃保温 60 min 去除酵母细胞壁,得到原生质体,取样镜检。

1.5.3 显微镜观察

1.5.3.1 悬滴法^[1]

用微量移液器或无菌滴管取已稀释好的酵母原生质体滴在盖玻片的中央,在盖玻片的边缘涂抹少量的凡士林,将盖玻片的菌液向下盖在凹玻片的凹槽上,制成悬滴,在光学显微镜下观察计数,然后转移到显微摄影仪下摄影。

1.5.3.2 血球计数板法^[2]

先将盖玻片放在血球计数板的计数室上,用微量移液器或无菌滴管取已稀释好的酵母原生质体滴在盖玻片的边缘,让菌液自行渗入,多余的菌液用滤纸吸去,静置片刻,待酿酒酵母细胞全部沉降到计数室底部,在光学显微镜下观察计数,然后转移到显微摄影仪下摄影。

收稿日期:2004-12-13

作者简介:刘青(1977-),讲师,博士生,从事生物工程的研究。

*肖冬光系通讯作者。

2 结果与讨论

通常观察酵母原生质体的常规方法为染色法与悬滴法^[1]相结合,即原生质体经染色后在凹玻片上用悬滴法进行观察^[3],此方法具有原生质体与背景颜色反差大、易观察的优点,但实际使用时存在许多缺点,例如染色过程中易造成原生质体的损伤破裂,制作的菌液悬滴以半球型附着悬在盖玻片上,原生质体在悬滴中处于不同平面,导致只能对某一层面的原生质体进行显微观察,而不能对菌液中的所有原生质体进行计数。使用血球计数板法(照片1、2)与悬滴法(照片3)对原生质体的显微摄影观察进行比较,见图1。从图1中较易看出,血球计数板法的观察效果较好,而且还可以对菌液中的原生质体进行计数,极大简化了对原生质体形成率的研究。

由于未染色的酿酒酵母是无色透明的,显微观察时如果透射光很强,原生质体与背景颜色的反差较小,不易观察;这时需要减弱外置光源或内置光源的强度,以增加原生质体与背景的反差,收到良好的观察效果;显微摄影时,可以使用内置光源加上黄色滤光片,以增大原生质体与背景的反差,获得良好的显微摄影效果。

3 结论

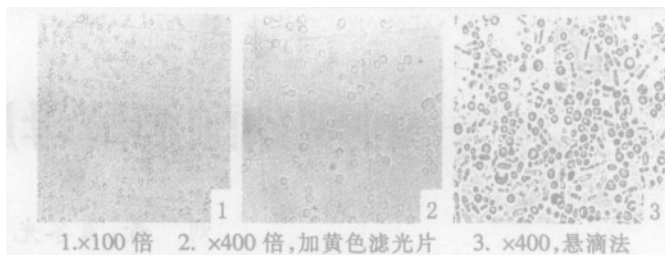


图1 原生质体显微摄影效果的比较

使用血球计数板法观察酿酒酵母原生质体,不需染色,只需使用血球计数板,在光学显微镜下便能清晰地观察原生质体形态,而且显微照相效果良好,还可以根据实验需要对原生质体进行计数,计算原生质体形成率,该方法具有程序简单、操作方便、效果良好的优点。

参考文献:

- [1] 范秀容,李广武,沈萍.微生物学实验(第二版)[M].北京:高等教育出版社,1991.
- [2] 杜连祥.工业微生物学实验技术[M].天津:天津科技出版社,1992.12-13.
- [3] 杨世辉,方呈祥,等.一种光学显微镜下观察原生质体的染色方法[J].微生物学通报.2000,27(1): 55-57.

(上接第122页)

机构,司机可单手同时操作主、副钩。同时挂卸抓斗方便,无需拆卸钢丝绳。无论是抓酒醅和醅渣及吊提活动式甑桶,均无需再配置其他辅助吊具。

2.2 提高劳动生产力。桁车改造后与其配套的项目——将甑桶稍加改造变为可提吊活动式。桁车可利用主、副钩配合,将甑桶提吊起,将醅渣均匀地铺摊于晾床上进行降温冷却,并可利用抓斗直接进行搅拌醅料装窖,从而大大减少工作量。同等工作量,如充分利用该设备,每班可减少工人两名。

2.3 可减轻工人劳动强度,缩短工作时间。由于改造后的桁车取代了许多人工作业,故减轻了工人劳动强度。改造后的桁车与改造前相比,同等工作量,每班缩短近1/3的作业时间。

2.4 节约能源,降低成本且故障较低。改造后的桁车虽为三钩,但仅为双机,减少一套提升制动机构,从而节约能源。由于减少一套提升制动机构,相应地也减少一套电气元器件及机械零部件和线路,所以故障率相应减少。同时由于两副钩共用一套提升制动机构,彻底消除了两副钩升降速度不同步,从而导致抓斗倾斜等弊病。

2.5 安全系数高。由于改造后的桁车为上下重叠十字型立体式,所配的抓斗为剪刀式,故桁车运行时抓斗的方向性、稳定性、垂直性极佳,抓斗的倾斜度几乎为零,对窖池窖泥的碰撞伤害极低,抓酒醅时工人下窖池辅助工作时间很短,抓斗对工人的碰撞几率几乎为零,安全系数较高。

2.6 对基酒不产生污染。由于采用专业的技术及独特

的工艺,改造后的桁车无滴、漏机械润滑油现象,所以对基酒的质量无任何影响,更不会产生污染。

3 强调说明

3.1 桁车改造后运行时需配置剪刀式抓斗。同时相对甑桶稍加改造成可提吊活动式(此两项费用极低),否则起不到降低成本、减轻工人劳动强度、提高效率之目的。

3.2 桁车的改造仅限于小车部分,不会改变整台设备的结构。对桁车的大、小车行走速度、起重量、提升高度等工作参数无任何影响。

3.3 改造后的三钩同时提吊,其提吊总重量不能超过桁车的额定起重量。

4 桁车改造具备的条件

4.1 桁车必须是双梁型(箱体式或花梁式均可),如果是单梁,则必须是箱体式L型,且起重量不低于3.5t。

4.2 厂房的人字梁的横梁与小车轨道的垂直距离应满足要求。

4.3 桁车的提升高度(大车的行走轨道与地平的垂直距离)应满足要求,否则剪刀式抓斗无法开启和闭合,活动式甑桶也无法提吊。

注:该项技术我公司已申报专利,专利类型为改进实用新型。专利名称为:白酒酿造车间双机三钩专用桁车(技术改造)。专利申报号:200520078594.0●